昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, April 2006, 49(2): 315 – 322 ISSN 0454-6296

近三年来国内昆虫生理生化与分子生物学重要研究进展评述

徐卫华

(中山大学生命科学学院昆虫学研究所,有害生物控制与资源利用国家重点实验室,广州 510275)

摘要: **作者收集了近 3 年来国内科学家在国际刊物上发表的重要论文,对这些工作给予了简要的介绍和评论。最近两年我国的昆虫生理生化与分子生物学研究和过去相比,取得了长足的进步,特别在基因测序(基因组、表达序列标签)、基因组的分子标记和利用基因组序列开展相关研究等方面进步尤为显著。但是和国际水平相比差距依然很大,如在克隆新的、重要的基因方面远远落后,鉴定基因的功能方面比较薄弱等。通过比较,既看到了该领域国内工作取得的成绩,也清楚地看到和国际一流水平相比存在的巨大差距,期待我国科学家鼓足勇气,凝炼目标和方向,在今后的研究中取得更新、更大的进步。**

关键词: **昆虫;生理学;生物化学;分子生物学;进展;评述;中国**

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)02-0315-08

Advances in insect physiology, biochemistry and molecular biology in the last three years in China mainland

XU Wei-Hua (State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The research articles from the field of insect physiology, biochemistry and molecular biology in the last three years published on international journals by Chinese scientists are introduced and commented in this review paper. A great progress has been made in China in the field, especially sequencing for genome and expressed sequence tags, molecular marker for genome and correlative researches in utilizing genomic sequence information. But a great gap still exists between domestic and international levels, such as cloning of novel or important genes and identifying their functions. We expect more pretty research present in the coming years.

Key words: Insect; physiology; biochemistry; molecular biology; progress; comment; China

2005 年 9 月中国昆虫学会生理生化与分子生物学专业委员会在北京召开学术讨论会,作者作为一名参加者,感受到最近两年我国在昆虫生理生化与分子生物学方面的长足进步,萌发了写此文的念头。尤其是生化与分子生物学已经成为生命科学研究的带头学科,在昆虫学科学研究中也已显示出越来越重要的地位,例如创刊仅十几年的《昆虫分子生物学》(Insect Molecular Biology)杂志成为刊登国际昆虫学研究论文 (research article) 影响因子最高的杂志;昆虫学研究水平最高的美国,每年要在南方的亚利桑那大学(University of Arizona)召开一次全国性的昆虫分子生物学学术讨论会,而且要求获得美国农业部(United States Department of Agriculture)基金项目的科学家必须出席该会议。由于许多国家的科学家踊跃参加该会议,该讨论会已经成为年度性的国际会议。作者因此动手收集 2004 和 2005 两年来我国科学家在国际上发表的生理生化与分子生物学论文,整理成此文介绍给国内读者。希望全国同行,尤其是作为科学研究主力的高等院校和科研院所的研究生借此能找准方向,鼓起勇气,在 2006 年上一个新台阶,为缩小我国和国际水平的差距而努力。作为 2004 和 2005 年进步的参照,把 2003 年也放进来,故称作近 3 年来昆虫生理生化与分子生物学重要进展评述。

作者简介:徐卫华,男,博士,教授,E-mail: whxu@ustc.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-11-29;接受日期 Accepted: 2006-03-07

1 2003 年进展评述

虽然化学感应蛋白（chemosensory proteins，CSP），性信息素结合蛋白（pheromone binding proteins，PBP）和气味结合蛋白（odorant-binding proteins，OBP）通常被归为 3 大类别，也有人认为三者是同类物，在体内化学因子的信号传递过程中起了非常重要的作用。中国农业大学张龙等人根据已知昆虫的 CSP 的基因序列，设计引物，从蝗虫 *Locusta migratoria* 触角克隆了一组 CSP cDNA（异构体），并鉴定出了一个和 CSP 结合的配体（oleoamide）（Ban *et al*.，2003）。体外表达 CSP 并用作竞争性活性分析，显示出 CSP 首先和配体的长链成分结合。这项工作是很有意义的，今后在 CSP 的三维结构的查明、不同异构体所起作用的差异等方面值得关注。中国农科院植物保护研究所吴孔明等人克隆了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* OBP2 cDNA，它特异性地表达在昆虫触角（Wang *et al*.，2003）。这个基因在 *E. coli* 中成功表达，利用表达产物制备多抗，发现雄虫主要表达在椎形感器（sensilla basiconica），雌虫主要表达在椎形感器和毛形感器上（sensilla trichodea）。气味结合蛋白在体内有多个功能，该项工作为今后查明气味结合蛋白在昆虫中的确切功能将起着重要作用。

家蚕 *Bombyx mori* 丝蛋白基因是广受关注的基因，也是分子生物学重点关注的对象。中国科技大学周丛照等人测定了家蚕丝蛋白基因上游 62 kb 的序列，发现 30% 是重复序列，有 24 个可以确定的核基质元件（matrix association region），还有一些有待进一步确定的核基质元件，推测有些重复序列、核基质元件和 DNase I 敏感位点等可能共同作用于家蚕丝蛋白基因的表达调节（Zhou *et al*.，2003）。如果今后阐明重复序列、核基质元件、DNase I 敏感位点等对丝蛋白基因转录的调节，是非常有意义的工作。

促前胸腺激素（prothoracicotropic hormone，PTTH）是昆虫最重要的神经肽激素之一，过去曾称作脑激素，调控昆虫的生长发育、蜕皮变态等诸多方面。自 1990 年家蚕 PTTH 基因克隆以后，世界上许多国家的科学家试图克隆其他物种的 PTTH 基因。完成家蚕 PTTH 基因克隆工作的学者还应邀将家蚕 PTTH cDNA 提供给世界各国的一些实验室，但没有得到成功克隆的消息。利用简并引物的 RT-PCR 结合 RACE（rapid amplification of cDNA ends）法，1996 年柞蚕 *Antheraea pernyi*、2001 年天蚕 *Hyalophora cecropia*、2003 年烟草天蛾 *Manduca sexta* PTTH cDNA 被成功克隆，但是这些物种在分类学上属于天蛾科和大蚕蛾科，和家蚕有很近的亲缘关系。1997 年曾在美国著名杂志 PNAS 上发表了分离纯化的果蝇 PTTH，但是和家蚕没有任何同源性，且刺激前胸腺合成蜕皮激素的活性也不高，所以很多人对这个结果存在争议，PTTH 在与家蚕远缘的其他物种是否存在倍受关注。作者等人以烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 和玉米夜蛾 *Helicoverpa zea* 两个夜蛾科昆虫为材料，克隆了 PTTH 基因，结构分析显示出夜蛾科昆虫该基因和已知的 PTTH 一样，有保守的结构，但也有夜蛾科昆虫独特的结构特征（Xu and Denlinger，2003；Xu *et al*.，2003）。同时我们也克隆了烟芽夜蛾的滞育激素（diapause hormone，DH）基因，PTTH 和 DH 基因的发育表达显示出和烟芽夜蛾蛹滞育的相关性，暗示 PTTH 和 DH 基因在调节蛹滞育方面的功能。夜蛾科昆虫 PTTH 的结构和功能、信号传递通路是今后值得关注的问题。

棉铃虫是蛹滞育昆虫，根据经典的昆虫滞育理论，蛹滞育是由 PTTH 和蜕皮激素控制的。有趣的是对棉铃虫 DH 基因研究，发现这个基因编码的 5 个神经肽 DH，即性信息素合成激活肽（pheromone biosynthesis activating neuropeptide，PBAN）和 α-、β-、γ-SGNP，有刺激蛹发育的功能。因为 DH-PBAN 基因是在食道下神经节表达，所以中国科技大学孙久松等人摘除棉铃虫食道下神经节，发现摘除后并不能使蛹发育停止，只是发育变慢（Sun *et al*.，2003）。追踪其原因，原来摘除食道下神经节后，胸神经节和腹神经节开始表达 DH-PBAN 基因，起了一定的补偿作用，这是首次发现 DH-PBAN 基因的补偿现象。但是一旦除去脑，蛹发育就停止，脑和食道下神经节在调控棉铃虫蛹发育（或滞育）过程中分别起到不同的作用。

2 2004 年进展评述

因为果蝇在生物科学研究中的重要地位，果蝇已经被认为是一般的生物学材料，并不把它划分在昆虫学领域。所以作为昆虫生理生化与分子生物学研究材料的模式物种主要是家蚕和烟草天蛾，加上最近异军突起的重要医学媒介昆虫——蚊虫。由西南农业大学夏庆友等人牵头组织国内多家单位参加的家蚕基因组测序工作发表在《Science》杂志上，家

蚕基因组序列覆盖 90.9%的已知家蚕基因，从基因组推测出 18 510 个基因，超过果蝇基因组序列报道的13 379个基因（Xia *et al*.，2004）。家蚕基因组的工作能在 Science 杂志上发表令大家欢欣鼓舞，这项工作之所以意义重大，是因为这么多的核苷酸序列蕴藏着极其宝贵的信息，例如利用已经完成的果蝇基因组序列，鉴定了一大批重要基因，成果倍出，像难度极大的膜蛋白受体等就是利用果蝇基因组序列鉴定成功的。今后家蚕基因组方面的工作一方面要完成填满序列空缺（gap），使基因组序列成为连续的；另一方面要利用基因组序列的信息鉴定一批具有重要功能的家蚕基因，数年内出一批重大成果，从而体现出我国家蚕基因组序列测定工作的重要性和价值。因为前面有果蝇基因组序列的成果作为参照，家蚕基因方面的成果产出显得更为迫切。夏庆友等人利用家蚕大造的 12 个 cDNA 文库所构建的 81 635 条 EST 序列，鉴定出了高质量的单核苷酸多态性的候选位点（Cheng *et al*.，2004）。这是一项基础性的工作，如果今后利用多态性位点来定位或鉴定出一些重要基因，将体现出这些候选多态性位点的价值，所以期待今后将这些成果有效地运用于家蚕的基因鉴定研究。

蝗虫是重要的迁飞害虫，一旦从散居型转化为群居型，就会出现迁飞危害。中国科学院动物研究所康乐等人为了研究蝗虫从散居型向群居型转化机理，测定了这两种类型共 76 012 条表达序列标签（expressed sequence tags，EST），鉴定了来自于中肠、足、头部等部位的 532 个相关基因，定量 PCR 测定了一些基因的表达，结果显示出其中一些基因的作用包含调节两型分化（Kang *et al*.，2004）。这项工作在国际著名杂志 PNAS 上发表，是我国昆虫学领域一项重要成果，它为今后查明调节两型分化的机理提供了线索。今后的工作重点是寻找调节两型分化直接相关的基因，推测这些基因很可能是转录因子或脑神经肽。

昆虫性信息素的合成路径的查明对害虫的预测预报和防治是至关重要的。中国科学院动物所赵成华等人研究了松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 性信息素的合成路径（Zhao *et al*.，2004a）。（顺）-5-十二碳烯醇（(*Z*)-5-dodecenol）和（顺，反）-5，7-十二碳二烯醇（(*Z*，*E*)-5，7-dodecadienol）能够经过碳链延伸到棕榈酸酯、硬脂酸盐再被合成，然后在 Δ11 位脱饱和、碳链短缩、还原成为性信息素成分。虽然有许多昆虫的性信息素的合成路径被研究，但是松毛虫性信息素的合成路径和其他物种还是有差别，可以为今后害虫防治提供线索，这也是它的意义所在。中国农科院植物保护研究所吴孔明等人克隆了棉铃虫性信息素结合蛋白（PBP），这个蛋白特异性地表达在触角，和气味结合蛋白（OBP）有部分相似的结构特征（Wang *et al*.，2004）。同时成功地将 PBP 在大肠杆菌中表达，利用这个表达产物制备多抗，调查了雌雄 PBP 的分布。这项工作是一个很好的开端，因为国外已有许多的 PBP 和 OBP 基因克隆和相关工作报道，而国内开展这方面的工作很少。如果这项工作继续深入，探索 PBP 的信号传递途径，或结合电生理工作，可能会有意外的收获。

蜕皮变态也是昆虫生理生化和分子生物学研究的重点科学问题。山东大学赵小凡等人鉴定了一个在棉铃虫蜕皮变态中调节基因转录的转录因子（HR3），这个基因拥有和 DNA 结合的序列和穿膜区域，在蜕皮时期特异性地表达（Zhao *et al*.，2004c）。这项工作是非常有意义的，因为已经发现一系列的激素、神经肽在蜕皮变态中起作用，如羽化激素（eclosion hormone，EH）、PTTH、羽化触发激素（ecdysis-triggering hormone，ETH）、心激肽（crustacean cardioactive peptide，CCAP）和鞣化激素（bursicon）等，HR3 的发现为寻找蜕皮级联的相关基因、澄清蜕皮机理起到重要作用，今后寻找 HR3 调节的基因将是首要工作。

许多与鳞翅目昆虫生殖、发育、蜕皮等重要行为相关的神经肽已经被克隆，它们的功能也得到了较深入的研究，例如 EH、促/抑咽侧体素（allatotropin/allatostatin）、PTTH、DH、PBAN 等。虽然这些激素基因具有非常有趣的表达模式，但是由于这些基因表达量低、细胞选择性强，它们的转录调节机理研究难度很大，一直未见报道。中国科技大学张天翼等人以家蚕为材料，鉴定了一个调控 DH-PBAN 基因转录的转录因子 POU-M2（Zhang *et al*.，2004a）。POU-M2 能结合在 DH-PBAN 基因的近距离启动子上，将 POU-M2 和家蚕 DH-PBAN 基因的启动子共转染，能大大提高 DH-PBAN 基因的启动子的活性。一旦将 POU-M2 的结合序列突变，启动子的活性大大下降，这是发现的第一个调节昆虫激素转录的转录因子，这项工作为今后研究昆虫神经肽基因的表达调控开辟了道路。家蚕抑前胸腺肽（prothoracicostatic peptide，PTSP）具有抑制 PTTH，从而抑制前胸腺分泌蜕皮激素的功能，浙江大学华跃进等人报道了将 PTSP 注射进家蚕 5 龄幼虫，可以显著地延长幼虫期

(Liu *et al*., 2004)。这项工作有助于理解神经肽调节蜕皮激素的合成与分泌,但 PTSP 的作用机理是今后需要解决的关键问题。

过去人们很少知道寄生蜂如何在寄主蛹体内"安营扎寨",浙江大学叶恭银等人以蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 和寄主菜粉蝶 *Pieris rapae* 为研究对象,发现寄生后导致寄主体内血细胞(hemocytes)失活,浆血细胞(plasmatocytes)显著减少和颗粒细胞(granular cells)的比例显著增加,蝶蛹金小蜂毒液能显著抑制寄主菜粉蝶细胞免疫,但不是破坏血细胞的细胞骨架(Cai *et al*., 2004)。这项工作的意义在于明确了通过蜂毒抑制寄主血细胞免疫,今后查明蜂毒的组分、蜂毒如何和寄主血细胞相互作用导致细胞失活的机理是值得关注的。

以家蚕为材料,中国农科院张志芳等人发现了一个家蚕突变——少翅脉,突变型和野生型的成虫盘相互移植实验证实是它们由于基因突变造成的(Zhou *et al*., 2004),一系列的实验证明少翅脉可能是缺氧导致翅脉发育受损造成的。这项工作实验思路清晰,方法巧妙,可以为今后的类似工作借鉴。浙江大学徐孟奎等人用双向电泳方法定量和定性研究了家蚕限性茧色品种的中部丝腺蛋白,两种性别中共发现约 1 000 个蛋白斑,这些蛋白分子量多数集中在 15 ~ 70 kD (Jin *et al*., 2004)。已有结果显示一些蛋白高表达在黄茧中,仅两个蛋白表达在雌性个体丝腺中。特异表达在黄茧的这些蛋白可能和茧色表型相关,这是我国科学家首次初步鉴定茧色相关蛋白,如果今后能鉴定出它的基因,明确它的功能,是很有意义的。

南京农业大学吴益东等人用不同来源抗除虫菊酯的棉铃虫进行实验,发现它们的抗性是不同的,经过用药物氰戊菊酯(fenvalerate)、氯氰菊酯(cypermethrin)或顺丁烯二酸二乙酯(deltamethrin)抗性筛选,棉铃虫的抗除虫菊酯活性大大提高(Yang *et al*., 2004)。有意思的是使用氰戊菊酯的同时使用胡椒基丁醚(piperonyl butoxide,PBO),发现 PBO 有协同作用,抗性会进一步提高,暗示抗性的提高包含在一个有氧代谢方面。实验结果表明细胞色素 P450 单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenases)可能在氧化降解代谢顺丁烯二酸二乙酯方面起主要作用。这项工作明确了棉铃虫抗除虫菊酯的可能机理,是非常有意义的。除了氧化降解代谢除虫菊酯类药物外,是否有其他途径提高抗性是需要进一步了解的。

中国科学院上海生化研究所 LIU Wang-Yi 等人分别用两种毒素辛纳毒蛋白(cinnamomin)和蓖麻毒素(均为核糖体失活蛋白)添食家蚕幼虫,表现出不同的半数致死率,但家蚕中肠也有降解两种毒素的功能(Wei *et al*., 2004a)。两种毒素处理纯化的家蚕 80S rRNA,会出现降解的特异性条带。实验证明两种毒素作用的不同在于毒素的 B 链,而不是 A 链。今后查明 B 链的不同与毒性的关系,能给人们新的启迪。

在家蚕,人们知道 DH 的功能是诱导卵滞育,但 DH 的功能并没有在其他物种中得到证实。近年来,一些昆虫的 DH 基因已经鉴定,但是不知道它的功能。中国科技大学张天翼等人克隆了蛹滞育昆虫棉铃虫 DH-PBAN cDNA,调查了 DH-PBAN 基因表达,发现在棉铃虫滞育过程中该基因表达是下调的,生物活性检测表明 DH 能够十分有效地打破滞育或刺激蛹发育,但不是诱导滞育,这是 DH 一个新功能的发现(Zhang *et al*., 2004b)。然后张天翼等人用定量 PCR 方法比较了滞育和非滞育棉铃虫的 DH-PBAN mRNA 数量变化,发现 DH-PBAN mRNA 数量在非滞育棉铃虫个体远高于滞育个体,免疫组织化学结果也证实 DH-PBAN 基因在非滞育棉铃虫个体中大量表达,和生物活性检测结果是一致的。进一步调查了 DH 和蜕皮激素的关系,发现 DH 在体内和体外都能激活前胸腺合成蜕皮激素,DH 的受体定位在前胸腺上,显示出 DH 打破滞育是通过激活前胸腺合成蜕皮激素,蜕皮激素直接引发滞育打破(Zhang *et al*., 2004c),此项工作的重要性在于阐明了滞育打破的机理。中国科学院动物研究所赵静雅等人用烟实夜蛾 *Helicoverpa assulta* 为材料,研究烟实夜蛾滞育和 DH 的关系,结果清楚地表明其非滞育个体的 DH-PBAN mRNA 量远高于滞育个体,烟实夜蛾 DH 也能很好地打破滞育,和棉铃虫相仿(Zhao *et al*., 2004b)。虽然已经证明了 DH 在夜蛾科蛹滞育昆虫中的功能,但是 DH 受体的鉴定、DH 是否还有其他生物学功能还需要进一步研究。

过去 DH-PBAN 基因鉴定主要来自家蚕和夜蛾科昆虫,蚕蛾科除了家蚕还没有其他物种报道。虽然利用家蚕 DH-PBAN 基因作为探针,克隆烟草天蛾等天蛾科或大蚕蛾科物种的 DH-PBAN 基因均没有成功,但免疫组织化学和 Southern 杂交的结果显示 DH-PBAN 基因在其他物种的存在。模式昆虫——烟草天蛾(天蛾科)是昆虫生理生化研究的好材料,尤其在美国广为使用。作者等人成功克隆了烟

草天蛾 DH-PBAN 基因，这是克隆的第一个天蛾科昆虫（Xu and Denlinger，2004）。烟草天蛾有良好的滞育特性，DH-PBAN 基因的鉴定将对昆虫滞育的机理研究起到重要作用。中国科技大学魏兆军等人克隆了蓖麻蚕 DH-PBAN 基因，用定量 PCR、Western blot、ELISA、免疫组织化学等方法在 RNA 和蛋白的水平上检测在蓖麻蚕不同发育时期其表达量变化、合成分泌部位等，PBAN 显示出促性信息素合成的活性（Wei *et al*.，2004b）。有趣的是蓖麻蚕是非滞育的昆虫，它的 DH 功能是什么将是非常有意思问题。

3　2005 年进展评述

南京农业大学的韩召军等人和英国科学家合作，研究了褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 对吡虫啉类农药抗性的产生机理（Liu *et al*.，2005b）。吡虫啉类农药是一种广泛使用的植物杀虫剂，褐飞虱是主要的水稻害虫，^{3}H 标记的吡虫啉能够大量地结合到对吡虫啉敏感的褐飞虱体膜，但是对抗性褐飞虱结合显著少。从敏感的或抗性的褐飞虱鉴定了 5 个乙酰胆碱受体（AChR）亚基，通过比较敏感的或抗性的褐飞虱两个点突变的乙酰胆碱受体（AChR）亚基，发现一个强的相关出现在点突变频率和吡虫啉抗性水平，突变导致减少^{3}H 标记的吡虫啉和褐飞虱体膜的结合。这是首次证明褐飞虱乙酰胆碱受体亚基突变造成对吡虫啉抗性的增强，论文发表在著名刊物 PNAS。此项工作漂亮地证明了单基因突变提高了抗性，但是除了乙酰胆碱受体，其他基因突变是否会提高抗性或者参与抗性提高是很有意思的问题。

由上海植物生理生态研究所黄永平组织国内和国外多家单位，用 518 个家蚕简单重复序列（simple sequence repeat，SSR）作为标记（markers），建立了遗传连锁图（genetic linkage map），包含了 29 条染色体（2n = 28），此项工作发表在著名的刊物 PNAS（Miao *et al*.，2005）。这是非常有意义的工作，因为家蚕基因组序列已经完成，这么多的分子标记可以为今后鉴定新的功能基因起重要作用。希望今后我国科学家能利用这些分子标记做出一系列重要成果，提高我国家蚕基因研究的水平。

棉铃虫和烟实夜蛾的性信息素的组分比例是不同的，中国科学院动物研究所王琛柱等人利用棉铃虫和烟青虫 *Helicoverpa assulta* 种间杂交，调查杂交后代的性信息素的组分比例，结果和棉铃虫相近，但不一样（Wang *et al*.，2005）。进一步调查了棉铃虫、烟青虫和杂交种的性信息素合成的特征，比较了三者之间的异同。这项工作是富有想象力的，结果也是非常有趣的，这些比较研究对人们理解物种的进化是有帮助的。当然，除了比较性信息素的组分比例和生物合成异同外，还可以比较其他的重要性状，坚持下去肯定会有一些重要发现。

西南农业大学周泽扬等人利用家蚕基因组序列，调查了家蚕长末端反转录转座子（long terminal retrotransposons，LTR），发现至少有 29 个独立的 LTR 家族，其中 24 个 LTR 家族是首次报道（Xu *et al*.，2005）。这 29 个家族大致可分成 3 类：14 个 gypsy，4 个 copia，7 个 Pao-Be，还有几个家族没有正常的编码区。论文对 29 个 LTR 家族的特性、分类进行描述和讨论。这些基础性的数据可能对基因的形成和进化的阐明起重要作用。西南农业大学夏庆友等人利用家蚕基因组序列鉴定了 277 个选择性拼接组分（alternative splice forms），大部分（74%）的选择性拼接定位在蛋白编码区，其中约 43% 的拼接位点编码区关系到与生物分子结合，少部分（26%）是出现在非翻译区，选择性拼接可产生大量不同的、功能差异的蛋白产物（Zha *et al*.，2005）。这些结果显示出为什么基因总数相对较少，而基因产物众多的原因，对昆虫生长发育的基因调节会有深入的认识，是有价值的发现。

保幼激素（juvenile hormone，JH）因是调控昆虫生长（包括滞育）的主要激素之一而受注目。近年来研究 JH 主要集中在调节 JH 合成和降解的相关神经肽和酶类，如 JH 降解主要有 JH 酯酶（JHE）、JH 环氧水解酶（ether hydrolase，JHEH）和 JH 二醇激酶（JH diol kinase，JHDK）控制，调节 JH 合成的有促/抑咽侧体素等。中国科技大学张其瑞等人和中国科学院上海植物生理生态研究所李胜等人分别克隆了家蚕 JHEH 和 JHDK，这两个基因表达显示出和 JH 降解的相关性，用昆虫杆状病毒作为载体，体外表达的 JHEH 和 JHDK 产物具有很高的降解 JH 活性（Li *et al*.，2005；Zhang *et al*.，2005）。这些工作将为寻找新的杀虫剂和查明昆虫滞育的机理创造了条件，但是今后需要解决的理论问题是在体内这 3 个酶是怎样协调起作用的？什么组织、什么时期、什么酶起主导作用？

促咽侧体素（allatotropin，AT）的功能是促进咽侧体的 JH 生物合成，中国科技大学尹晗等人克隆了棉铃虫 AT 基因（Yin *et al*.，2005）。在完成棉铃虫 AT cDNA 克隆的同时，发现了棉铃虫 AT mRNA

的 4 种不同拼接 (splicing) 方式,而且其中两种是新的拼接类型。AT 的主要的表达部位和不同拼接类型出现最多的部位是腹神经节,而不是脑。免疫组织化学确定了棉铃虫脑 AT 的合成部位,这些结果和过去的报道是不一样的,富有创新性。但是这些不同的拼接类型在发育过程中起什么作用还不清楚,在不同组织的表达的功能差异是今后需要解决的问题。

关于昆虫滞育光周期的假说有多种,江西农业大学薛芳森等人用环带锦斑蛾 *Pseudopidorus fasciata* 为材料,调查了光周期和温度对幼虫滞育诱导的情况,做出了许多有价值的发现 (Hua *et al*., 2005a, 2005b)。发现短的黑暗对滞育的影响大于长光照,低温有利于滞育。当黑暗被 1 小时光照打断,如果连续黑暗超过临界时间 10.5 h,滞育还是被诱导。滞育诱导的敏感期在幼虫第 4 天,系列实验证明积累长或短光周期对于滞育诱导的机理是不同的。进一步又研究了环带锦斑蛾的光周期对滞育诱导和打破,发现在 22℃、25℃、28℃度条件下,滞育与否取决于黑暗超过或低于临界时间,在 25℃和 28℃条件下,临界光照时间是 10.5 h 在 22℃条件下,临界时间是 10 h。将多种短光照虫转移到长光照下,达到 50% 滞育率需要的时间是不同的,所有的结果显示黑暗时间被测定,和临界时间比较后定为"长"或"短"。即光周期信息的积累存在一个阈值,即需要积累一定数量的长夜或短夜循环去诱导 50% 的个体发育或滞育。这些工作是非常重要而有意义的,它澄清了该物种滞育诱导的温度和光周期的作用。

过去研究的推论是半胱氨酸蛋白酶参与降解卵黄蛋白,但没有确切的证据。山东大学赵小凡等人将家蚕半胱氨酸蛋白酶 B 基因在 *E. coli* 成功表达,制备的抗体用于免疫组织化学研究。发现半胱氨酸蛋白酶在家蚕胚期表达并显示出水解活性,半胱氨酸蛋白酶被定位在滤泡细胞的卵黄颗粒和雌成虫脂肪体细胞 (Zhao *et al*., 2005)。这些结果显示半胱氨酸蛋白酶参与降解卵黄蛋白的功能。此项工作是对过去假说的又一证明,是非常有意义的。今后直接证明半胱氨酸蛋白酶降解卵黄蛋白是有必要的,从而从根本上解决半胱氨酸蛋白酶的功能问题。

虽然生物活性鉴定证明棉铃虫 DH 的功能是打破蛹滞育或加速蛹发育,但缺乏系统的比较研究。中国科技大学孙久松等人用免疫组织化学和原位杂交等方法,系统地比较了滞育和非滞育棉铃虫的 DH-PBAN 基因在整个发育过程的变化 (Sun *et al*., 2005)。首先定位 DH-PBAN 基因在食道下神经节的 12 个神经分泌细胞表达,进一步调查了滞育和非滞育棉铃虫的 DH-PBAN 基因在幼虫、蛹期的表达差异。在幼虫期,滞育类个体 DH-PBAN 基因表达量高,暗示 DH 可能应答滞育诱导;在蛹期,非滞育类个体 DH-PBAN 基因表达量高,暗示 DH 可能应答刺激蛹发育或打破滞育。免疫组织化学显示 DH-PBAN 基因产物的分泌的位点和释放路径是在心侧体。此项工作是对过去'DH 刺激蛹发育或打破滞育'结论的进一步证明,但是棉铃虫滞育的诱导问题依然没有解决,这是一个富有悬念的科学问题,今后应加以关注。

2004 年以前只有家蚕的 DH-PBAN 基因序列 (genomic DNA) 被报道。为了研究棉铃虫 DH-PBAN 基因的表达调控,中国科技大学张天翼等人克隆了棉铃虫 DH-PBAN 全基因序列,这是第 2 个在 GenBank 登录的 DH-PBAN 基因全序列 (Zhang *et al*., 2005)。Southern 杂交分析显示棉铃虫 DH-PBAN 基因是单拷贝,引物延伸实验确定转录的起始位点,发现了和家蚕启动子的序列异同,其中之一是 POU-M2 结合序列完全一样。但是 POU-M2 并不象家蚕那样起到重要的作用,显示棉铃虫 DH-PBAN 基因表达的调节和家蚕是不同的。

PTTH 调节蜕皮激素的合成是通过安定结合抑制剂 (diazepam-binding inhibitor, DBI) 来实现的。为了搞清楚 PTTH 调节蜕皮激素的机理,中国科技大学刘明等人克隆了棉铃虫 DBI cDNA,发现 DBI 在滞育和非滞育棉铃虫表达的模式不同,在非滞育棉铃虫表达远高于滞育个体,暗示 DBI 在 PTTH-蜕皮激素通路上起重要作用 (Liu *et al*., 2005a)。进一步用 DBI 保育前胸腺,发现能够刺激蜕皮激素的合成。这项工作为今后阐明 PTTH 信号传递打下基础,是有价值的工作,需要指出的是今后应围绕 DBI 上下游的信号传递开展工作。

棉铃虫是蛹滞育昆虫,蛹滞育是与激素 PTTH 相关。中国科技大学魏兆军等人克隆了棉铃虫 PTTH cDNA,并在体外成功表达 (Wei *et al*., 2005)。以表达的棉铃虫 PTTH 作为抗原,制备出多克隆抗体,用定量 PCR、Western blot、免疫组织化学等方法,在 RNA 和蛋白的水平上检测不同发育时期表达量变化,确定脑部的 2 对合成分泌细胞合成 PTTH,而且显示出 PTTH 和棉铃虫蛹滞育相关联。棉铃虫 PTTH 和 DH 都和滞育打破相关,这两个激素如何协调或分别起作用是值得思索的问题。

4 展望

近两年来我国的昆虫生理生化与分子生物学研究和过去相比，取得了长足的进步，特别在测序（基因组、EST）、基因组的分子标记和利用基因组序列开展的相关研究进步尤为显著，发表了多篇高水平的论文。此外，基因的克隆和表达研究也成果可喜，有多个研究小组能独立完成全基因的克隆和相关研究。但是和国际水平相比差距依然很大，体现在：1）我们在鉴定新的、重要的基因方面远远落后，多数克隆的基因是跟踪国外的发现，而不是在国际上率先、首次，说明我们工作的源头创新不足，基础欠扎实。2）生理学实验是解决基因功能的唯一手段，有无相关功能的实验结果，是论文水平高低的一个重要标志。国内有重生化和分子生物学而忽视生理学的倾向，这点体现在国内刊物上发表的相关昆虫生化和分子生物学论文尤为明显，许多论文通篇是为了克隆而克隆，一点生理学实验也没有，一点也不涉及基因的功能。与之形成强烈对比的是国际上非常重视基因功能，没有相关的功能研究，仅仅涉及基因序列的论文是要被退稿，发表不了的。再如近年来“系统生物学”一词很热，就是要把许多细胞、分子水平上的微观认识综合起来回答某一个生物学问题（即功能），改变孤立地研究个别基因而不注重整体水平上的功能。3）缺乏系统性。纵观国外高水平的实验室，都是从不同的角度、不同的路径瞄准同一个目标，即要解决某一个生物学问题，连续多年发表的论文都是相互间有密切相关的。由于我国科学研究体制的独特性，很少有围绕同一个主题长期深入研究的，从连续 3 年发表的论文可以清楚地看出围绕一个科学问题连续发表高水平论文的实验室太少。上述这几个问题制约了我国昆虫生理生化与分子生物学的发展，如果国内同行能够意识到这些问题并加以改正，相信将会迎来我国的昆虫生理生化与分子生物学研究的黄金时期。期待更多有志于昆虫学研究的学生加入到我们的队伍中来，建功立业，做出一流的成绩。

附注　本文评述的所谓重要进展是指在国际昆虫生理生化与分子生物学刊物或其他国际知名刊物上发表的研究工作，这些发表论文可以是和国外合作的成果，但要求通讯作者或第一作者必须是华人，署名单位必须有国内的单位，但香港、澳门和台湾学者的论文没有包括。因本文收录的论文全部是英文发表，而第一作者多为学生，故难以确定其汉语姓名，所以除了作者熟知的第一作者外，均引用实验室负责人或通讯作者的姓名。由于文献收录可能有疏漏或作者选择论文时的标准相异而没有被包含，或个别地方评述有误和不当，欢迎批评指正。

致谢　中国科技大学生命科学学院崔帅英、刘健、侯成林同学帮助收集文献，在此表示感谢。

参 考 文 献（References）

Ban L, Scaloni A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Molec. Biol.*, 12: 125 – 134.

Cai J, Ye GY, Hu C, 2004. Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitold, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): effects of parasitization and venom on host hemocytes. *J. Insect Physiol.*, 50: 315 – 322.

Cheng TC, Xia QY, Qian JF, Liu C, Lin Y, Zha XF, Xiang ZH, 2004. Mining single nucleotide polymorphisms from EST data of silkworm, *Bombyx mori*, inbred strain Dazao. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 34: 523 – 530.

Hua A, Xue FS, Xiao HJ, Zhu XF, 2005a. Photoperiodic counter of diapause induction in *Pseudopidorus fasciata* (Lepidoptera: Zygaenidae). *J. Insect Physiol.*, 51(12): 1 287 – 1 294.

Hua A, Yang D, Wu S, Xue FS, 2005b. Photoperiodic control of diapause in *Pseudopidorus fasciata* (Lepidoptera: Zygaenidae) based on a qualitative time measurement. *J. Insect Physiol.*, 51: 1 261 – 1 267.

Jin YX, Chen YY, Xu MK, Jiang YH, 2004. Studies on middle silkgland proteins of cocoon colour sex-limited silkworm (*Bombyx mori* L.) using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biosci.*, 29: 45 – 49.

Kang L, Chen XY, Zhou Y, Liu BW, Zheng W, Li RQ, Wang J, Yu J, 2004. The analysis of large-scale gene expression correlated to the phase changes of the migratory locust. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 17 611 – 17 615.

Li S, Zhang QR, Xu WH, Schooley DA, 2005. Juvenile hormone diol kinase, a calcium-binding protein with kinase activity, from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 35: 1 235 – 1 248.

Liu M, Zhang TY, Xu WH, 2005a. A cDNA encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA binding protein in *Helicoverpa armigera*: molecular characterization and expression analysis associated with pupal diapause. *Comp. Biochem. Physiol.*, 141: 168 – 176.

Liu X, Tanaka Y, Song QS, Xu BJ, Hua YJ, 2004. *Bombyx mori* prothoracicostatic peptide inhibits ecdysteroidogenesis *in vivo*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 56: 155 – 161.

Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han ZJ, Millar NS, 2005b. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to midacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 8 420 – 8 425.

Miao XX, Xu SJ, Li MH, Li MW, Huang JH, Dai FY, Marino SW *et al*., 2005. Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 16 303 – 16 308.

Sun JS, Zhang TY, Zhang QR, Xu WH, 2003. Effect of the brain and suboesophageal ganglion on pupal development in *Helicoverpa armigera* through regulation of FXPRLamide neuropeptides. *Reg. Peptides*, 116 (1 – 3): 163 – 171.

Sun JS, Zhang QR, Zhang TY, Zhu ZL, Zhang HM, Teng MK, Niu LW, Xu WH, 2005. Developmental expression of FXPRLamide neuropeptides in peptidergic neurosecretory cells of diapause-and nondiapause-destined individuals of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Gen. Comp. Endocri*., 141: 48 – 57.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2003. Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein gene from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochem. Molec. Biol*., 33: 115 – 124.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2004. Molecular cloning and bacterial expression of pheromone binding protein in the antennae of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 57: 15 – 27.

Wang HL, Zhao CH, Wang CZ, 2005. Comparative study of sex pheromone composition and biosynthesis in *Helicoverpa armigera*, *H. assulta* and their hybrid. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 35: 575 – 583.

Wei GQ, Liu RS, Wang QO, Liu WY, 2004a. Toxicity of two type Ⅱ ribosome-inactivating proteins (cinnamomin and ricin) to domestic silkworm larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 57: 160 – 165.

Wei ZJ, Zhang TY, Sun JS, Xu AY, Xu WH, Denlinger DL, 2004b. Molecular cloning, developmental expression, and tissue distribution of the gene encoding DH, PBAN and other FXPRL neuropeptides in *Samia cynthia* ricini. *J. Insect Physiol*., 50: 1 151 – 1 161.

Wei ZJ, Zhang QR, Kang L, Xu WH, Denlinger DL, 2005. Molecular characterization and expression of prothoracicotropic hormone during development and pupal diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol*., 51: 691 – 700.

Xia QY, Zhou ZY, Lu C, Cheng DJ, Dai FY, Li B, *et al*., 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306: 1 937 – 1 940.

Xu JS, Xia QY, Li J, Pan GQ, Zhou ZY, 2005. Survey of long terminal repeat retrotransposons of domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Insect Biochem. Molec. Biol*., 35: 921 – 929.

Xu WH, Denlinger DL, 2003. Molecular characterization of prothoracicotropic hormone and diapause hormone in *Heliothis virescens* during diapause, and a new role for diapause hormone. *Insect Molec. Biol*., 12: 509 – 516.

Xu WH, Rinehart JP, Denlinger DL, 2003. Structural characterization and expression analysis of prothoracicotropic hormone in the corn earworm, *Helicoverpa zea*. *Peptides*, 24: 1 319 – 1 325.

Xu WH, Denlinger DL, 2004. Identification of a cDNA encoding DH, PBAN and other FXPRL neuropeptides from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* and expression associated with pupal diapause. *Peptides*, 25: 1 099 – 1 106.

Yang Y, Wu Y, Chen S, Devine GJ, Denholm I, Jewess P, Moores GD, 2004. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 34: 763 – 773.

Yin H, Zhang TY, Xu WH, 2005. Structural organization and expression analysis of the cDNA encoding allatotropin in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 60: 71 – 83.

Zha XF, Xia QY, Zhao P, Li J, Duan J, Wang ZL, Qian JF, Xiang ZH, 2005. Detection and analysis of alternative splicing in the silkworm by aligning expressed sequence tags with the genomic sequence. *Insect Molec. Biol*., 14: 113 – 119.

Zhang QR, Xu WH, Chen FS, Li S, 2005. Molecular and biochemical characterization of juvenile hormone epoxide hydrolase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 35: 153 – 164.

Zhang TY, Kang L, Zhang ZF, Xu WH, 2004a. Identification of a POU factor involved in regulating the neuron-specific expression of the gene encoding diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in *Bombyx mori*. *Biochem. J*., 380: 255 – 263.

Zhang TY, Sun JS, Zhang LB, Shen JL, Xu WH, 2004b. Cloning and expression of the cDNA encoding the FXPRL family of peptides and a functional analysis of their effect on breaking pupal diapause in *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol*., 50: 25 – 33.

Zhang TY, Sun JS, Zhang QR, Xu J, Jiang RJ, Xu WH, 2004c. The diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide gene of *Helicoverpa armigera* encodes multiple peptides that break, rather than induce, diapause. *J. Insect Physiol*., 50: 547 – 554.

Zhang TY, Sun JS, Liu WY, Kang L, Shen JL, Xu WH, 2005. Structural characterization and transcriptional regulation of the gene encoding diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1 728: 44 – 52.

Zhao CH, Adlof RO, Löfstedt C, 2004a. Sex pheromone biosynthesis in the pine caterpillar moth, *Dendrolimus punctatus* (Lepidoptera: Lasiocampidae): pathways leading to *Z*5-monoene and 5,7-conjugated diene components. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 34: 261 – 271.

Zhao JY, Xu WH, Kang L, 2004b. Functional analysis of the SGNP I in the pupal diapause of the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Reg. Peptides*, 118: 25 – 31.

Zhao XF, Wang JX, Xu XL, Li ZM, Kang CJ, 2004c. Molecular cloning and expression patterns of the molt-regulating transcription factor HHR3 from *Helicoverpa armigera*. *Insect Molec. Biol*., 13: 407 – 412.

Zhao XF, An XM, Wang JX, Dong DJ, Du XJ, Sueda S, Kondo H, 2005. Expression of the *Helicoverpa* cathepsin B-like proteinase during embryonic development. *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 58: 39 – 46.

Zhou CZ, Confalonieri F, Esnault C, Zivanovic Y, Jacquet M, Janin J, Perasso R, Li ZG, Duguet M, 2003. The 62-kb upstream region of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene is clustered of repetitive elements and candidate matrix association regions. *Gene*, 312: 189 – 195.

Zhou QX, Tang SM, Chen Y, Yi YG, Zhang ZF, Shen GF, 2004. A scaleless wings mutant associated with tracheal system developmental deficiency in wing discs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Inter. J. Dev. Biol*., 48: 1 113 – 1 117.

(责任编辑：袁德成)